

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Hoofd- en halskanker (HNC) is wereldwijd de zevende meest voorkomende kanker. Helaas ontwikkelt ongeveer 40% van de HNC-patiënten die met radiotherapie worden behandeld xerostomie (droge mond syndroom) als gevolg van de onbedoelde bestraling van de speekselklieren. Deze exocriene organen, gelegen in en rondom de orale en faryngale gebieden, zijn verantwoordelijk voor speekselproductie, zijn cruciaal voor het behoud van mondgezondheid, het doorslikken van voedsel en het ondersteunen van spraak. De door radiotherapie veroorzaakte schade aan acinaire cellen van de speekselklieren, en het verlies van functionele stam-/voorlopercellen van de speekselklieren, belangrijk voor weefselvernieuwing en regeneratie, tast de weefselfunctie en het herstel vermogen ernstig aan. Dit kan leiden tot langdurige klierdisfunctie, wat de levenskwaliteit van patiënten ernstig beïnvloedt.

Recente verbeteringen in bestralingstechnieken, zoals protontherapie, zijn ontwikkeld om de preciezer te bestralen en nevenschade te minimaliseren. Ondanks deze verbeteringen wordt nog steeds vaak aanzienlijke levenslange schade aan omliggende gezonde weefsels veroorzaakt.

Geavanceerde in vitro-modellen, zoals speekselklier organoïden, bieden een veelbelovend platform voor het onderzoek naar stralingsreacties. Deze organoïden zijn verrijkt met stam-/voorlopercellen en met diverse andere cel populaties en maken gedetailleerd onderzoek mogelijk naar de signaalroutes die worden geactiveerd door bestraling. Inzichten verkregen uit dergelijke modellen kunnen richting geven aan de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën die de weefsel integriteit in stand houden of herstellen en tegelijkertijd de effectiviteit van kankerbehandelingen maximaliseren.

Volwassen of weefselspecifieke stam-/voorlopercellen zijn cruciaal voor weefselhomeostase en het bevorderen van regeneratie na schade. Genotoxische stress kan hun levensduur en functionele capaciteit van deze stam-/voorlopercellen aanzienlijk aantasten. **Hoofdstuk 2** geeft een overzicht van de belangrijkste signaalroutes en gebeurtenissen die worden geactiveerd door DNA-schade en met focus op de micro-omgeving en functie van stam-/voorlopercellen. In de loop der jaren is de dubbelstrengs (ds)DNA-sensor cGAS erkend als een cruciale speler bij het initiëren van sterke interferon reacties en immuun activatie in zowel normale weefsels als kankercellen. Recent zijn meerdere andere sensoren, zoals de dsRNA-receptoren RIG-I en MDA5, en ZBP1, geïdentificeerd als aanvullende regulerende factoren voor interferon activatie.

DNA-schade kan ook cellulaire veroudering veroorzaken, dit wordt gekenmerkt door een aanhoudende celcyclus blokkering en een ontstekingsfenotype. Straling geïnduceerde veroudering is vooral relevant voor het

verlies van het zelfvernieuwingspotentieel van stamcellen en dus weefseldegeneratie. De afgifte van de aan dit proces gerelateerde cytokinen kunnen immuun cellen aantrekken, wat bijdraagt aan een ontstekingsreactie. Deze door DNA-schade gemedieerde immuun modulerende reacties verstoren de homeostase gereguleerd door de weefsel specifieke stamcellen en kunnen leiden tot degeneratie van het weefsel. Omgekeerd kan de afgifte van specifieke cytokinen de plasticiteit en regeneratieve capaciteit van weefsel specifieke stamcellen juist verbeteren maar ook de activiteit van kanker stamcellen bevorderen, wat mogelijk tumorgroei stimuleert.

Mitochondriën zijn dynamische organellen die essentieel zijn voor het behoud van cellulaire stofwisseling en algehele functie van de cel. Disfunctionele mitochondriën worden geassocieerd met cellulaire veroudering en de ontregeling van stam-/voorlopercellen, wat uiteindelijk bijdraagt aan weefseldisfunctie en aandoeningen. In hoofdstuk 3 wordt onderzocht hoe ioniserende straling de dynamiek van mitochondriën beïnvloedt en hoe dit gerelateerd is aan veroudering en het zelfvernieuwingsvermogen van stam-/voorlopercellen. Na foton bestraling vertoonden speekselklier organoïden een sterke verstoring van mitofagie en mitochondriale dynamiek, processen die cruciaal zijn voor de effectieve verwijdering en vernieuwing van beschadigde mitochondriën en een de daaraan gerelateerde cel functie. De bestraalde organoïden vertoonden een duidelijke ophoping van lange, disfunctionele mitochondriën, gekoppeld aan cellulaire veroudering en uitputting van stam-/voorlopercellen. Farmacologische interventies in de inductie processen van mitochondriale splitsing of mitofagie herstelden deze processen, wat leidde tot een significante verbetering van de mitochondriale functie, vermindering van veroudering en verbetering van het zelfvernieuwingsvermogen van de organoïden. Dit onderzoek laat een potentiële veelbelovende strategie zien om het stamcel potentieel na bestraling te verbeteren door mitochondriale disfunctie en veroudering aan te pakken.

Hoofdstuk 4 gebruikten wij ons speekselklier organoïde model om de moleculaire mechanismen te bestuderen die geactiveerd worden door fotonen (röntgen)- en protonenbestraling. Beide soorten bestraling veroorzaakten een sterke type-I interferon (IFN-I) signaalrespons. Deze werd in vroege stadia voornamelijk gemedieerd door cytoplasmatische micronuclei-geïnduceerde cGAS-activatie en in latere fasen door mtDNA-herkenning. Opvallend genoeg induceerde protonen bestraling een sterkere interferonrespons op latere tijdstippen, gedreven door van transponeerbare elementen (TE)-afgeleide (ds)RNA-vorming en daaropvolgende RIG-I activatie. De aldus verhoogde IFN-I respons bleek cruciaal voor het zelfvernieuwingsvermogen en de proliferatie van stam-/voorlopercellen. IFN- β behandeling verbeterde significant de van organoïden en de proliferatie van stam-/voorlopercellen in foton bestraalde monsters.

In **Hoofdstuk 5** hebben we multi-omics toegepast om ons begrip van de cellulaire populaties van speekselklier organoïden op verschillende tijdstippen en in reactie op stralingsschade te verdiepen. Cel specifieke RNA-sequentiebepalingen toonde de aanwezigheid van potentiële speekselklierstam-/voorlopercellen aan, die verhoogde stamceleigenschappen vertoonden na oppervlakte-marker-specifieke cel sortering. Aldus hebben we een nieuwe cel populatie gevonden die mogelijk een acinaire voorlopercellen vertegenwoordigt, en die gekenmerkt door epitheliale-mesenchymale-achtige kenmerken en een vermogen tot migratie heeft. Verder toonde bioinformatica-analyses en in vitro validatie aan dat stam-/voorlopercellen van de speekselklier afhankelijk zijn van Notch-siginaaltransductie om hun migratiecapaciteit en zelfvernieuwingspotentieel na bestraling te behouden.

Naast Notch-siginaaltransductie speelt de Hippo-siginaalroute een cruciale rol in de regulatie van weefselgroei en regeneratie. In **Hoofdstuk 6** gebruikten we in vivo en in vitro modellen om de rol van YAP, een belangrijke component van de Hippo-siginaalroute tijdens homeostase en regeneratie van speekselklieren te onderzoeken. Door farmacologische en genetische modulatie van YAP-activiteit zagen we dynamische verschillen tussen Hippo-signalen tijdens homeostatische en gedurende herstel van extensieve weefselschade. YAP-activiteit bleef laag tijdens homeostatische omstandigheden, maar nam aanzienlijk toe na schade aan de speekselklier. Versterking van de YAP-nucleaire translocatie verbeterde de regeneratie en proliferatie van speekselklieren aanzienlijk. Deze bevindingen benadrukken de cruciale rol van YAP bij het reguleren van plasticiteit en regeneratie van beschadigde speekselklieren, en bieden potentiële strategieën om herstel van speekselklieren te verbeteren, met name na straling geïnduceerde schade.

Tot slot toont deze thesis aan hoe organoïde modellen kunnen worden gebruikt om de moleculaire mechanismen te onthullen die worden beïnvloed door bestraling met fotonen en protonen. Het valideren van deze resultaten in (pre-)klinische contexten is cruciaal voor het optimaliseren van de behandelingen van hoofd- en halskanker, het verbeteren van de levenskwaliteit en het bevorderen van het herstel van patiënten. De integratie van immuuncellen in geavanceerdere modellen zou het mogelijk maken om ontstekings- en immuunreacties onder fysiologisch relevantere omstandigheden te evalueren. Bovendien zou een dieper begrip van de populaties van stam- en voorlopercellen in de speekselklieren, evenals hun complexe regulatienetwerken, bijdragen aan de ontwikkeling van effectievere, gepersonaliseerde therapeutische benaderingen.